

## 博士論文要約

### 論文題目

『漬物中における不揮発性アミン類含有量とそれらの含有に関わる要因』

半 田 彩 実

### 序論

アレルギー様食中毒の原因物質であるヒスタミン (Him) は、魚介類やそれらの水産加工品が主な原因食品であるが<sup>1),2)</sup>、その他にもチーズをはじめ、醤油や味噌などの発酵食品中にも含有し、これらの発酵食品では、Himのみならずチラミン (Tym) などの不揮発性アミン類 (以下、アミン類) も比較的多く含有することが知られている<sup>3)-8)</sup>。発酵食品のうち、漬物も一部発酵により製造されているが、野菜の漬物に関してのアミン類の報告<sup>9),10)</sup>は少なく、国産の漬物についての報告はほとんど見られない。健全な食生活を過ごす上で、漬物中のアミン類について調査し、その結果を把握することは必要であると考え、

本研究では、まず、迅速に漬物中の含有量調査が行えるよう、食品中のアミン類の分析法について検討し、その分析法を用いて漬物中のアミン類含有量調査を行うと共に、各種の漬物に含有されるアミン類の由来について明らかにした。さらに、それらの漬物中から Him および Tym の生成に関わる微生物の探索を行い、漬物中に含まれるアミン類の含有に関わる要因について明らかにすることを試みた。

### 第1章 ダンシル誘導体化によるアミン類の分析法

食品中のアミン類含有量調査を迅速に行えるよう、HPLC によるダンシル誘導体化法を検討した。アミン類の相互作用による影響も考え、Him, Tym をはじめ、プトレシン (Put)、カダベリン (Cad) およびスペルミジン (Spd) を含めた一斉分析法を検討した。

本分析法は、固相抽出カラムとして、強カチオン交換カラムである InertSep MC-1 を用い、食塩濃度を 0.5 %に調製した試料溶液を 3 mL 負荷することとした。さらに、溶出には次操作のダンシル誘導体化を見据え、少ない溶出量と確実に 5 種のアミン類を溶出するため、1 mol/L 炭酸カリウム溶液で溶出することとした。

これまでのダンシル誘導体化法は、炭酸ナトリウム中で反応させていたが、今回、炭酸カリウム中でも反応することを明らかにした。そのため、カラムからの溶出液をそのままダンシル誘導体化することができ、減圧濃縮操作を不要とした。さらに、アセトニトリル溶解液を 5 %プロリン・1 mol/L 炭酸カリウム溶液で振とう洗浄することにより、過剰なダンシル誘導体化剤を除去し、良好なクロマトグラムが得られるようにした。定量下限も検査指針の参考法 (A)<sup>11)</sup>に比べて低い値まで測定でき、高感度な分析を可能とした。本分析法を用いて 9 食品について各アミンの添加回収試験を行った結果、食品により差はある

ものの、いずれの食品にも適用できる結果が得られた。より簡便なダンシル誘導体化法として、十分使用できる分析法を確立することができた。

## 第2章 市販漬物中のアミン類含有量と含有由来

国産の漬物について、アミン類に関する報告はほとんど見られないことから、第1章で確立した分析法を用い、市販漬物中のアミン類含有量調査を行った。さらに、漬物の原材料中のアミン類含有量も調査し、各種の漬物に含有されるアミン類の由来を明らかにした。

漬物中のアミン類含有量は、5種のアミン類のうち、Put は全ての漬物から 0.4~61.7  $\mu\text{g/g}$  検出され、Cad は醤油漬、味噌漬、もろみ漬、かす漬、こうじ漬および赤唐辛子漬全てから 0.2~28.9  $\mu\text{g/g}$  検出された。また、Him および Tym の含有量は、それぞれ 6.0~264, 2.0~369  $\mu\text{g/g}$  と比較的高い値を示した。Spd は種類に差があるものの、ほとんどの漬物から 0.9~17.2  $\mu\text{g/g}$  検出された。

今回の調査結果から、漬物中にはアミン類が存在することが認められた。特に、味噌漬やもろみ漬では Him および Tym の含有量が他のアミンと比較して高かった。また、同じ種類の漬物によっても含有量に差が見られたのは、使用された原材料の違いやそれらの配合割合、漬け期間など、製造方法の違いによると考えられた。

次に、漬物中に含まれるアミン類の由来を明らかにするため、原材料中のアミン類含有量を調査した。主な漬け原材料中のアミン類含有量は、醤油ともろみから全てのアミン類が検出され、特に Him および Tym の含有量が他の漬け原材料と比較して高く、逆に塩および砂糖からは検出されなかった。その他は、食品により含有量に差が見られた。

生鮮野菜中のアミン類含有量は、5種のアミン類のうち、Put および Spd は全ての野菜から検出された。Him および Tym はナスから検出され、特に Him は天然の食材としては非常に高い値を示した。今回の調査により、国産のナスからも Him および Tym は検出されること、またその含有量は、Him では比較的高い値であることが明らかとなった。

これらの含有量結果より、市販漬物中から検出されるアミン類の由来は、Put, Cad および Spd は、野菜中にもともと含まれるものや、漬け原材料に含まれるアミン類が野菜に移行し、検出されたと考えられた。一方、Him および Tym については、同様に漬け原材料が由来して検出されたと考えられる漬物もあるが、ぬか漬、かす漬およびこうじ漬においては、製造過程にアミン類を生成する微生物が関与し、生成されたと考えられた。条件によっては、これらが高濃度にアミン類を生成する可能性もあるため、これらを生成する微生物を探索する必要があると考えられた。

## 第3章 漬物中のヒスタミンおよびチラミン産生菌とヒスタミンおよびチラミンの生成

第2章の結果より、ぬか漬、かす漬およびこうじ漬においては、発酵の間に微生物が関与し、Him および Tym が生成されていると推察された。これまで、キムチ<sup>9)</sup>やからし菜

の塩漬<sup>10)</sup>から Him 産生菌を単離している報告はあるが、漬物における Tym 産生菌の存在はほとんど知られていない。そこで、Him および Tym の生成において、発酵の間に微生物が関与していると推察された漬物類から、アミン産生菌の探索を試みた。

各産生菌を探索したところ、ぬか漬中から Him 産生菌 1 株および Tym 産生菌 7 株を単離することができ、ぬか漬中にアミン産生菌の存在が確認された。また、ぬか漬には食塩が含まれていることから、これらアミン産生菌の食塩濃度によるアミン産生能の確認を行ったところ、Him 産生菌は 10 %、Tym 産生菌は 6 %までの生育と産生能が認められた。一般的なぬか漬の食塩濃度は高くても 5 %程度<sup>12)</sup>であることから、Him および Tym 産生菌共に、ぬか漬中でも生育可能な菌であり、それぞれ Him および Tym を産生することができると考えられた。

## 総括

本研究は、食品中のアミン類について、それらの含有量と含有要因について明らかにすることを目的とし、発酵食品のアミン類に焦点を絞り行った。

はじめに、これまで操作が煩雑であるとの指摘が多いダンシル誘導体化を用いたアミン類 5 種の一斉分析法を検討した。固相抽出カラムの変更などにより、簡便なダンシル誘導体化法として、十分使用できる分析法を確立することができた。

次に、確立した分析法を用いて、市販漬物中のアミン類含有量調査を行った。市販漬物中のアミン類含有量だけでなく、主な原材料中のアミン類含有量から各漬物中のアミン類の由来を類推し、漬物の種類により含有由来は異なることを明らかにすることができた。

そして、ぬか漬およびかす漬中から Him および Tym 産生菌を探索した結果、ぬか漬中からそれぞれの産生菌を単離することができた。ぬか漬中に各アミン産生菌の存在が確認された。

以上の結果から、漬物中に含まれるアミン類は、漬け原材料、野菜中にもともと含まれるアミン類の他、細菌が産生するアミン類に由来すると考えられた。漬物中のアミン類は、漬物の種類によって含有要因は異なることが明らかとなった。

## 文献

- 1) 観公子, 牛山博文, 新藤哲也, 斉藤和夫. 市販魚介類およびその加工品中のヒスタミン含有量調査, 食品衛生学雑誌, 46, 127-132 (2005).
- 2) 登田美桜, 山本都, 畝山智香子, 森川馨. 国内外におけるヒスタミン食中毒, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 127, 31-38 (2009).
- 3) 井部明広, 田村行弘, 上村尚, 田端節子, 橋本秀樹, 飯田真美, 二島太一郎. 市販味噌及び醤油中の不揮発性アミンの分析法及びその含有量, 衛生化学, 37, 379-386 (1991).
- 4) 井部明広, 上村尚, 田端節子, 早野公美, 田村行弘. 発酵食品中の不揮発性アミン類の

- 含有量調査（第 1 報），東京都立衛生研究所年報, 46, 102-107 (1995).
- 5) 井部明広, 上村尚, 田端節子, 早野公美, 木村祐起子, 友松俊夫. 発酵食品中の不揮発性アミン類の含有量調査（第 2 報），東京都立衛生研究所年報, 47, 90-94 (1996).
  - 6) Kung, H. F., Tsai, Y. H., Wei, C. I. Histamine and other biogenic amines and histamine-forming bacteria in miso products. *Food Chemistry*, 101, 351-356 (2007).
  - 7) Byun, B. Y., Mah, J. H. Occurrence of Biogenic Amines in Miso, Japanese Traditional Fermented Soybean Paste. *Journal of Food Science*, 77, 216-223 (2012).
  - 8) Guidi, L. R., Gloria, M. B. Bioactive amines in soy sauce: Validation of method, occurrence and potential health effects. *Food Chemistry*, 133, 323-328 (2012).
  - 9) Tsai, Y. H., Kung, H. F., Lin, Q. L., Hwang, J. H., Cheng, S. H., Wei, C. I., Hwang, D. F. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in kimchi products in Taiwan. *Food Chemistry*, 90, 635-641 (2005).
  - 10) Kung, H. F., Lee, Y. H., Teng, D. F., Hsieh, P. C., Wei, C. I., Tsai, Y. H. Histamine formation by histamine-forming bacteria and yeast in mustard pickle products in Taiwan. *Food Chemistry*, 99, 579-585 (2006).
  - 11) 社団法人 日本食品衛生協会. 食品衛生検査指針 理化学編 2015. 東京, 2015, p.784-795.
  - 12) 白石泰夫. 日本食品成分表 2017 七訂 本表編. 東京, 医歯薬出版, 2017, p.38. (ISBN 978-4-263-70677-0).

#### 関連する業績

##### ・ 発表論文

1. 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広. ダンシル誘導体化反応の改良による食品中の不揮発性アミン類分析法, *食品衛生学雑誌*, 58, 149-154 (2017).
2. 半田彩実, 川鍋ひとみ, 井部明広. 市販漬物中の不揮発性アミン類含有量とそれらの含有由来, *食品衛生学雑誌*, 59, 36-44 (2018).